

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. November 2002 (14.11.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/089776 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 9/51,
47/42, 47/48, A61P 25/04, 25/28, A61K 31/197, 31/451,
31/4741, 31/704

(DE). ALYAUTDIN, Renad, N. [RU/RU]; Horoshevskoc
sch. 19-128, Moscow, 123007 (RU).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/04735

(74) Anwalt: FLACCUS, Rolf-Dieter; Bussardweg 10, 50389
Wesseling (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
30. April 2002 (30.04.2002)

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): JP, KR, US.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE, TR).

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 21 982.2 5. Mai 2001 (05.05.2001) DE

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für die folgenden Bestimmungsstaaten JP, KR, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR)
- Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): LTS LOHMANN THERAPIE-SYSTEME AG [DE/DE]; Lohmannstrasse 2, 56626 Andernach (DE).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KREUTER, Jörg [DE/DE]; Georg-August-Zinn-Strasse 13, 61350 Bad Homburg (DE). LANGER, Klaus [DE/DE]; An der Turnhalle 5, 61137 Schöneck (DE). WEBER, Carolin [DE/DE]; Im Reichen Winkel 34b, 93057 Regensburg

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: NANOPARTICLES MADE OF PROTEIN WITH COUPLED APOLIPOPROTEIN E FOR PENETRATION OF THE BLOOD-BRAIN BARRIER AND METHODS FOR THE PRODUCTION THEREOF

(54) Bezeichnung: NANOPARTIKEL AUS PROTEIN MIT GEKOPPELTEM APOLIPOPROTEIN E ZUR ÜBERWINDUNG DER BLUT-HIRN-SCHRANKE UND VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG

(57) Abstract: The invention relates to nanoparticles for penetration of the blood-brain barrier, characterized in that they consist of a hydrophilic protein or a combination of hydrophilic proteins, preferably serum albumen, most preferably of human origin, which is coupled to apolipoprotein B. the invention also relates to methods for the production of said nanoparticles.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Nanopartikel zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie aus einem hydrophilen Protein oder einer Kombination hydrophiler Proteine bestehen, vorzugsweise aus Serumalbumin, das besonders bevorzugt humanen Ursprungs ist, an die Apolipoprotein B gekoppelt ist, sowie Verfahren zur Herstellung derartiger Nanopartikel.



WO 02/089776 A1



Europäisches
Patentamt
European Patent
Office
Office européen
des brevets

Description of WO02089776

Print

Copy

Contact Us

Close

Result Page

Notice: This translation is produced by an automated process; it is intended only to make the technical content of the original document sufficiently clear in the target language. This service is not a replacement for professional translation services. The esp@cenet® Terms and Conditions of use are also applicable to the use of the translation tool and the results derived therefrom.

Nanoparticles from protein with coupled apolipoprotein E for the overcoming of the blood-brain barrier and method to its preparation the instant invention concern nanoparticles from an hydrophilic protein or a combination of hydrophilic proteins, preferably from serum albumin, in particular human origin, which can overcome the blood of brain cabinets by means of bound apolipoprotein E, in order to transport pharmaceutical or biological active agents in the Liquor cerebrospinalis.

Nanoparticles are particles with a magnitude between 10 and 1000 Nm, which from artificial or natural macromolecular substances prepared to become to be able. To such nanoparticles drugs or other biological active material can become covalent, ionic or adsorptive bound or into the material of the nanoparticles incorporated.

So far however only nanoparticles from Polyalkylcyanoacrylaten, which became with polysorbate 80 (Tween* 80) or other surfactants coated, in the layer, the blood brain of cabinets were to be overcome, in order to transport hydrophilic drugs to the Liquor cerebrospinalis and cause pharmacological effects. The mechanism of this transport is based after prior studies on the fact that apolipoprotein E (ApoE) is adsorbed by the coat from polysorbate 80 by the nanoparticles. Thus probably pretend Lipoprotein particles, which become bound of the LDL receptors of the brain capillary endothelial cells, which ensure the Lipidversorgung of the brain these particles, recognized and.

Series of drugs could by means of Polybutylcyanoacrylat nanoparticles coated with polysorbate 80 or other surfactants over the blood-brain barrier transported who that and a significant pharmacological effect cause. Examples for so administered drugs are Dalgargin, a Endorphin Hexapeptid, Loperamid and Tubocuarin, the two NMDA receptorantagonists March 2/576 and/or.

March 2/596 of the companies Merz, Frankfurt, as well as the anticancer agent doxorubicin.

The drawbacks of the Polybutylcyanoacrylat nanoparticles lie however in the fact that polysorbate is 80 not physiological and that the transport could over the blood-brain barrier possibly on a toxic effect polysorbate 80 be based. A coat of Polybutylcyanoacrylat nanoparticles with polysorbate 80 or other surfactants is however essential for the transport the Polybutylcyano acrylates nanoparticles over the blood-brain barrier. The known Polybutylcyanoacrylat nanoparticles have however the other drawback that both the connection of the ApoEs as well as the drugs only adsorptive made. Thus the ApoE bound to the nanoparticles lies and/or. the drug in the balance with free ApoE and/or. Drug forwards, and it can take place after injection into the organism a rapid desorption of these fabrics from the particles. In addition most drugs bind not in sufficient extent at Polybutylcyanoacrylat nanoparticles and cannot become thus not with the help of this carrier system over the blood-brain barrier transported.

The instant invention was the basis the object to make nanoparticles available to the overcoming of the blood-brain barrier which the aforementioned drawbacks do not have and which bottom avoidance not physiological surfactants the apolipoprotein E necessary for the transport over the blood-brain barrier to have not only adsorbed.

The object became surprisingly dissolved, which are of an hydrophilic protein or a combination well tion hydrophilic proteins, by nanoparticles, of serum albumin, particularly preferred of human serum albumin, or a comparable protein to preferably consist, to the apolipoprotein E covalent or coupled over the Avidin/Biotin system.

With the albumins it acts around a group of proteins, those particularly in animal/human liquids, z. B. the serum albumin in the blood, or tissues occur. Albumins are rich at negative loaded amino acids as well as at leucines and isoleucine. Compared with they the accompanying globulins possess the albumins lower molecular weights and are only precipitable by relative high salt concentrations.

Also gelatin A, gelatin B, casein or comparable proteins are according to invention suitable as output proteins for the nanoparticles.

The apolipoprotein E is a component the lipoprotein of complexes. These complexes from lipids and apolipoproteins the possible transport of the lipids in the blood, insoluble in the water. The ApoE mediated probably the transport of the nanoparticles according to invention over the blood-brain barrier, by binding to the LDL receptors of the brain capillary endothelial cells.

The nanoparticles according to invention can exhibit additional or several functional proteins, which are bound over bifunctional Spacermoleküle at thiol groups with thiol groups modified nanoparticles. The preparation of such nanoparticles the functional groups located on the surface of the nanoparticles (amino group, carboxyl groups, hydroxyl groups) can become by suitable reagents reactive thiol groups reacted. Functional proteins can then over bifunctional Spacermoleküle, which exhibit a reactivity both opposite amino group and free thiol groups, to which Thiolgruppen modified nanoparticles bound become.

⌘ top

The functional proteins which can be coupled in this way to the nanoparticles can become from the group selected, the avidin, Avidinderivate, apolipoproteins, like z. B. Apolipoprotein E, in addition, antibody, enzymes and such a thing covers. The functional proteins themselves can have a pharmacological or a biological effect.

In a preferred embodiment point the invention would in accordance with-eat nanoparticles covalent coupled avidin up, over which biotinylated apolipoprotein can become E bound, as in fig 1 illustrative shown is. Avidin is a glycoprotein high-affine for biotin, which can be covalent by the before mentioned bifunctional Spacermoleküle to the thiol groups of the thiolierten nanoparticles bound. By the covalent bond of the avidin to the nanoparticles biotinylated ApoE, which is necessary for the transport over the blood-brain barrier, cannot only become bound, but a variety of biotinylated molecules can become particularly efficient by the Avidinmodifizierten nanoparticles bound. Particularly preferred becomes thereby pharmacological or biological active molecules.

In order to obtain pharmakologische effects, herein would in accordance with-eat nanoparticles know pharmacological or biological active substances to exhibit. These active ingredients can be or become into the nanoparticles incorporated bound of the Nanopartikel. The connection of the pharmacological or biological active agents can be made both covalent, komplexierend by the Avidin biotinsystem and inkorporativ or adsorptive.

The nanoparticles according to invention are suitable particularly good, in order to bind and transport over the blood-brain barrier drugs, which exhibit no or no sufficient transition over the blood-brain barrier, as for example for Dalargin, Loperamid, Tubocuarin or doxorubicin or such a thing, and cause pharmacological effects.

The method to the preparation of the Nanopartikel according to invention takes from an hydrophilic protein or a combination of hydrophilic proteins for the overcoming of the blood-brain barrier covers the subsequent steps: - Desolvation of the aqueous solution of the hydrophilic

Protein or a combination of hydrophilic proteins, - stabilization by Desolvation of the developed Nanoparticles by crosslinking,

Convert a part of the functional groups on that

Surface of the stabilized nanoparticles to reactive thiol groups, - covalent attaching of functional proteins by means of bifunctional Spacermoleküle, - Biotinylierung of apolipoprotein E, if the portion has to do not point covalent coupled apolipoprotein E, - loaded ones of the Avidin modified nanoparticles with biotinylated ApoE and pharmacological active ingredient which can be given.

For the preparation of the nanoparticles an hydrophilic protein or a combination of hydrophilic proteins becomes used as starting material. Preferably an aqueous solution is desolvated by serum albumin, particularly preferred of human serum albumin, bottom agitation. The resultant nanoparticles will become by crosslinking stabilized and the functional groups (amino group, carboxyl groups, hydroxyl groups) on the surface of the nanoparticles by suitable reagents reactive thiol groups are set.

The Desolvation from the aqueous solvent made preferably by the addition of ethanol. A Desolvation is in principle also by the addition of other water-mixable nonsolvents for hydrophilic proteins such as acetone, isopropanol or methanol possible. Thus gelatin was desolvated as output protein successful by addition of acetone. Also a Desolvation of proteins loosened in aqueous phase is possible by addition of structure-forming salts as magnesium sulfate or ammonium sulfate. In this case one speaks of salting out.

As Quervernetzer to the stabilization of the nanoparticles come bifunctional aldehydes, preferably glutaraldehyde, as well as formaldehyde into question. Furthermore a crosslinking of the nano-particle matrix is possible by thermal processes. Stable nano-particle systems became obtained with 60 °C over periods of more as 25 hours or 70 °C over periods of more than 2 hours.

The Biotinylierung of the nano-particle surface can become after various principles performed. Preferably the amino group on the particle surface with 2-Iminoethanol, that with primary amino group on the particle surface responsive, become to free thiol groups on the particle surface reacted. Besides thiol groups can become also by reductional cleavage of the disulphide connections with Dithiotreitol (DTT), present at the surface of the Nanopartikelmatrix, obtained. Alternative ones can become free carboxyl groups of the particle surface with 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid (EDC) /Cystein or with EDC /Cystaminiumdichlorid reacted and the so introduced disulphide connections subsequent cleaved reductional with DTT.

Functional proteins can over bifunctional Spacermoleküle, which exhibit a reactivity both opposite amino group and opposite free thiol groups, to which Thiolgruppen modified nanoparticles coupled become.

More applicable heterobifunctional Spacermoleküle with reactivities is opposite carboxyl or hydroxyl groups, in addition, homobifunktionale Spacermoleküle with reactivities opposite amino group. A preferred substance, which can take over the function of a bifunctional Spacermoleküls, is m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinimidester (SulfoMBS). Beside m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfo also other heterobifunktionale Spacermoleküle became more succinimidester such as Sulfosuccinimidyl-4 [N-maleimidomethyl] - cyclohexane-1-carboxylate (sulfoSMCC) or Sulfosuccinimidyl2 [m-azido-o-nitrobenzamido] - ethyl 1, 3-dithiopropionat (SAND) as well as the homobifunktionale Spacermoleküle Dimethyl-3,3'-dithiobispropionimidat dihydrochlorid (DTBP) or 3,3'-Dithiobis[2-sulfo-succinimidylpropionat] (DTSSP) successful used. However heterobifunktionale Spacermoleküle preferred becomes, since homobifunktionale Spacermoleküle leads as side reaction to the attachment of a functional protein to the nano-particle surface also to a possible intramolecular crosslinking.

In one preferred process avidin or a Avidin derivative becomes particularly by means of the bifunctional Spacermoleküle to the thiolierten nanoparticles coupled. This intermediate, Avidin modified nanoparticles, represents an universal carrier system for a variety biotinylated substances, which over the Avidin biotincomplex formation bound to become to be able.

The connection of the human apolipoprotein E to the Avidinmodifizierten nanoparticles the apolipoprotein E can become by conversion with N-Hydroxysuccinimidobiotin (NHS biotin) biotinylated. Other Biotinylierungsreagenzien, which reacts with amino group or other functional groups to binding protein, is likewise more applicable. As other functional groups to binding protein come for the Biotinylierung also free sulfhydryl groups or carboxyl groups into question. Alternative

Biotinylierungsreagenzien für amino group differs from the NHS biotin in the aminoreaktiven functionality, by her z. B. Pentafluorphenyl groups in place of Succinimido groups have, or in the range between biotin and the aminoreaktiven functionality.

In order to obtain pharmacological effects, pharmaceutical or biological active substances become direct into the particles incorporated or and/or. indirect to the Avidinmodifizierten nanoparticles bound. The Avidinmodifizierten nanoparticles can become simultaneous or in arbitrary sequence with biotinylated apolipoprotein E and a pharmaceutical agent loaded. The connection of the active ingredient can be made both covalent, komplexierend by the Avidin biotinsystem and adsorptive.

The nanoparticles according to invention from an hydrophilic protein or a combination of hydrophilic proteins, the apolipoprotein E bound have, are suitable, pharmaceutical or biological active agents, which would not pass otherwise the blood brain of cabinets, in particular hydrophilic active ingredients to transport over the blood-brain barrier and cause pharmacological effects. Examples for such active ingredients are Dalargin, Loperamid, Tubocuarin, doxorubicin or such a thing.

Thus the described wirkstoffbeladenen nanoparticles are suitable to the treatment of a variety cerebral diseases. The active ingredients bound to the carrier system become selected after the respective therapy goal. The carrier system offers itself particularly for the active ingredients, which exhibit no or no sufficient transition over the blood of brain cabinets. As active ingredients cytostatic drugs come to the therapy of cerebral Tumore into consideration, active ingredients to the therapy of viral infections into the cerebral range, for example HIV infections, in addition, active ingredients to the therapy of dementia diseases, in order to enumerate only some applications.

FIG. 1 shows a preferred embodiment of the invention would in accordance with-eat nanoparticles without active ingredient or other transmitting IO nelles protein.

Subsequent one becomes the invention on the basis an exemplary embodiment illustrated, whereby this representation the sense and the nature of the invention is to become in no manner limitative construed.

The preparation of nanoparticles from human serum albumin (HSA) 200 mg became human serum albumin in 2,0 ml gereinigtem water dissolved. This solution bottom agitations on a magnetic stirrer (500 RPM) 8.0 ml 96 volume became. - % ethanol dropwise added.

The generated nanoparticles became stabilized, as the reaction 235 uZ an aqueous, 8%-igen (m/v) became Glutaraldehydlösung added and over 24 hours with clearing mdu ratur agitated. The stabilized nanoparticles became purified by five times Abzentrifugieren (16,000 rcf, 8 min) and Redispergieren in 1,5 ml purified water.

By gravimetric determination the resultant content of nanoparticles in the suspension found became.

Subsequent ones became 2.0 ml the nano-particle suspension with 2,0 ml a solution of 13 mg 2-Iminothiolan (Traut's reagent) in trichloroethylene buffer (pH 8.5) staggered and over 24 hours agitated, in order to thiolieren the particle surface. The nanoparticles became described above purified after Thiolierung like.

The Avidin derivative NeutrAvidin[®] became over m-Maleimidobenzoyl-N-mere hydroxysulfosuccinimidester (sulfoMBS), one than bifunctional Spacermolekül functioning substance, covalent to thiolierten nanoparticles the bound. For this purpose the Avidin derivative became activated, as a solution of 5,0 mg NeutrAvidin in 1, 0 ml PBS buffers (pH 7.0) with 1,6 mg sulfoMBS staggered and over 1 hour with room temperature agitated became. Free sulfoMBS became over a large out conclusion chromatography of the activated NeutrAvidin separated.

The fractions, in which by spectrophotometric detection with 280 Nm wavelength could become NeutrAvidin detected, became combined and with 2,0 ml the thiolierten nanoparticles staggered and over 1 hour agitated with room temperature. The Avidin modified HSA nanoparticles became described above purified like.

Apolipoprotein E (ApoE) became biotinylated, as 250 pg ApoE in 125 became ul isotonem PBS buffer, pH 7.4, dissolved and this solution with a solution of 150 became ug NHS biotin (NHydroxysuccinimidobiotin) in 15 ul DMSO staggered. After a reaction time of 2 hours with 10 C bottom agitations became this mixture with other 300 pl PBS buffers, pH 7.4, diluted. Still free NHS biotin became separated over a size exclusion chromatography of the biotinylated ApoE. The fractions, in which by photometric detection with 280 Nm wavelength was more detectable ApoE, became combined and freeze dried.

The Avidin modified HSA nanoparticles became more immediate before the bioassay with the biotinylated ApoE and the drug Dalargin loaded. For this the freeze dried ApoE in 250 ul distilled water dissolved and with 280 became ul a HSA Nanopartikelsuspension, which contained 5.9 mg Avidinmodifizierte HSA nanoparticles, staggered. A solution of 1, 125 mg Dalargin into 470 ul waters was kubierte added and the mixture over 3 hours with room temperature in. After this incubation the mixture became by addition of 500 u1 isotonem PBS buffer, pH 7.4, diluted.

A quantitation of the loading of the Avidin modified HSA nanoparticles with Dalargin resulted in that with a ratio of Dalargin/Nanopartikeln = 191 pg/mg an adsorptive connection of 23,7 pg/mg (= 12.4%) Dalargin made.

The application-finished preparation contained in a total volume of 1, 5 ml isotonem PBS buffer: - 3, 93 mg/ml Avidin modified HSA nanoparticles - 167 lig/ml ApoE (over Avidin biotinsystem to the nano particle bound) - 0, 75 mg/ml Dalargin (of it 12.4% adsorptive at nano particle bound).

The preparation became mice i. v. in a dosage of 7,5 mg/kg Dalargin applied. That corresponds to a mouse on the basis of an average body weight from 20 g, an application quantity of 200 and. l of the listed above preparation for each mouse.

The analgetische effect (Nociceptive response) became determined with the help of the Tail repair test, with which an hot light beam becomes on the tail of the mouse projected and the time measured, until the mouse pulls the tail away. After 10 seconds (= 100% mdu) the experiment became stopped, in order to cause to the mouse no damage. The maximal possible analgetische effect (mdu = maximally possible effect) became determined in accordance with the subsequent formula:

Reaction time after application reaction time before application % mdu = X 100

Abort time reaction time before application of negative mdu values arise, if the mouse pulls its tail away after

administration of the preparation earlier as before the treatment.

With the help of Dalargin loaded Avidin modified HSA nanoparticles became after intravenous injection the analgetischen effects achieved represented in table 1.

Table 1 Analgeti effect [% mdu] with mice (n=6) after i. v. Application of Dalargin (7.5 mg/kg) in form of one of the listed preparations. (Mdu = maximal Possible Effect) preparation 30 min 45 min 90 min 120 min HSA-Avidin-25, 1 12,4 49.0 23.7 2.1 ~ 19, 6-0,23 12.3 nanoparticles + ApoE + Dalargin KontrollenHSA avidin--2, 6 3,9-5,4 ~ 10, 9-14, 4 ~ 17, 4-9.6 t of 20.6 nanoparticles + Dalargin PBCA-35,2 5.8 49.5 4, 5 36, 5 ~ 13, 7,7,1 6.3 nanoparticles + Dalargin + polysorbate 80 Dalargin solution 10,0 9,8,9.3 ~ 2, 8,4.7 t 5.1,2.0,6,1

The PBCA nanoparticles + Dalargin + polysorbate 80 and the Dalargin solution

Comparative data originate from an earlier experiment.

The results show that the analgetischen effects achieved with the Avidin modified HSA nanoparticles correspond to the effects, which with the Polybutylcyano acrylate Nanopar tikeln (PBCA nanoparticles) achieved to become to be able.



Europäisches
Patentamt
European Patent
Office
Office européen
des brevets

Claims of WO02089776

Print

Copy

Contact Us

Close

Result Page

Notice: This translation is produced by an automated process; it is intended only to make the technical content of the original document sufficiently clear in the target language. This service is not a replacement for professional translation services. The esp@cenet® Terms and Conditions of use are also applicable to the use of the translation tool and the results derived therefrom.

- P A t e n t A n s p r u c h e I.** Nanoparticles for the overcoming of the blood-brain barrier, characterised in that it from an hydrophilic Protein or a combination of hydrophilic proteins stands, to the apolipoprotein E coupled or bound is.
2. Nanoparticles according to claim 1, characterised in that that at least an hydrophilic protein from that Group selected is, the serum albumin, gelatin A, Ge latine B, casein and comparable proteins, or one Combination of these proteins covers.
 3. Nanoparticles according to claim 1 or 2, thus gekenn draw that at least an hydrophilic protein huma nen origin is.
 4. Nanoparticles after one of the preceding claims, characterised in that it or several bottom schiedliche functional proteins exhibit, those over bifunctional Spacermoleküle at thiol groups of Thiolgruppen modified nanoparticles bound are.
 5. Nanoparticles according to claim 4, characterised in that the functional proteins selected are from that Group, the avidin, Avidin derivatives, apolipoproteins, Antibody, enzymes, hormones, cytostatic drugs and such a thing cover.
 6. Nanoparticles according to claim 5, characterised in that biotinylated apolipoprotein E over covalent ge ouple width units avidin bound are.
 7. Nanoparticles according to claim 6, characterised in that at least an other biotinylated funktionel les protein over covalent coupled avidin bound are.
 8. Nanoparticles after one of the preceding claims, characterised in that it pharmacological or biological active agents incorporated or bound have.
 9. Nanoparticles according to claim 8, characterised in that the pharmacological or biological active affect materials the particle surface bound are.
 10. Nanoparticles according to claim 8, characterised in that the pharmacological or biological active effect of materials covalent, komplexierend over the Avidin biotin System or adsorptive bound is.
 11. Nanoparticles after one of the claims 8 to 10, characterised in that the active ingredients selected are from the group, which covers Dalargin, Loperamid, Tubocuarin and Dox orubicin.
 12. Method to the preparation of nanoparticles from an hydrophilic protein or a combination more hydrophilic Proteins, for the overcoming of the blood-brain barrier, there by characterized that it seizes the subsequent steps over: - Desolvatieren of an aqueous solution one hydrophi len protein or a combination hydrophilic pros teine, - stabilization by Desolvatation of the developed Nanoparticles by crosslinking, - shifting of a part of the functional groups on the surface of the stabilized nanoparticles to reactive Thiol groups, - covalent attaching of functional proteins, preference/advantage wise of avidin, by means of bifunctional Spacermole küle, - Biotinylierung apolipoprotein of the E, - loaded ones of the Avidin modified nanoparticles with biotinylated apolipoprotein E, - loaded ones of the Avidin modified nanoparticles with biotinylated apolipoprotein E and other radio tionellen proteins or pharmaceutical or biolo gisch active agents.
 13. Process according to claim 12, characterised in that the hydrophilic protein from the group selected is, the serum albumin, gelatin A, gelatin B, casein and comparable proteins, or a combination of these Proteins covers.
 14. Process according to claim 12 or 13, thus identified-calibrates net that the hydrophilic protein of human origin is.
 15. Process according to one of claims 12 to 14, characterised in that the Desolvatieren by agitation and Addition of a water-mixable nonsolvent for hydrophilic proteins or by salting made out.
 16. Process according to claim 15, characterised in that the water-mixable Nichtlösungsmittel for hydrophilic Proteins from the group selected, the ethanol becomes, Methanol, isopropanol, and acetone cover.
 17. Process according to one of claims 12 to 16, characterised in that for the stabilization of the nanoparticles thermal processes or bifunctional aldehydes or Formaldehyde used becomes.



top

18. Process according to claim 17, characterised in that as bifunktionales aldehyde glutaraldehyde used becomes.

19. Process according to one of claims 12 to 18, characterised in that as Thiolgruppen modifying Agent a substance used becomes, which is selected from the group, the 2-Iminoethanol, a combination out 1-Ethyl-3 (3-dimethylaminopropyl) carbodiimid and cysteine or a combination from 1-Ethyl-3 (3 - dimethylaminopropyl) carbodiimid and Cystaminiumdichlorid as well as Dithiotreitol covers.

20. Process according to one of claims 12 to 19, characterised in that as bifunctional Spacermolekül a substance used becomes, which selects from the group ausgie is, m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfon succinimidester, Sulfosuccinimidyl-4 [N-maleimido methyl]cyclohexan-1-carboxylat, Sulfosuccinimidyl-2 [m-azido-o-nitrobenzamido] - ethyl-1, 3dithiopropionat, Dimethyl-3,3-dithiobispropionimidat-dihydrochlorid and 3,3 " - Dithiobis [sulfosuccinimidylpropionat] covers.

21. Process according to one of claims 12 to 20, characterised in that the active ingredients selected is from the group, which covers Dalargin, Loperamid, Tubocuarin and Doxorubicin.

22. Use of nanoparticles, comprehensively hydrophilic Protein or a combination of hydrophilic proteins, those Apolipoprotein E bound have, to the transport pharmazeutisch or biological active agents over those Blood-brain barrier.

23. Use according to claim 22, characterised in that at least one of the hydrophilic proteins from that Group selected is, the serum albumin, gelatin A, Gelatine B, casein and comparable proteins, or one Combination of these proteins covers.

24. Use according to claim 22 or 23, thus gekennzeichnetes that at least one of the hydrophilic proteins of human origin is.

25. Use from nanoparticles to one of the claims 22 to 24, characterised in that the active ingredients selected are from the group, the Dalargin, Loperamid, Tubocuarin and doxorubicin cover.

26. Use from nanoparticles to one of the claims 22 to 25, characterised in that it the treatment cerebral diseases used become.

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. November 2002 (14.11.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/089776 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 9/51,
47/42, 47/48, A61P 25/04, 25/28, A61K 31/197, 31/451,
31/4741, 31/704

(DE). ALYAUTDIN, Renad, N. [RU/RU]; Horoshevskoc
sch. 19-128, Moscow, 123007 (RU).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/04735

(74) Anwalt: FLACCUS, Rolf-Dieter; Bussardweg 10, 50389
Wesseling (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
30. April 2002 (30.04.2002)

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): JP, KR, US.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE, TR).

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 21 982.2 5. Mai 2001 (05.05.2001) DE

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für die folgenden Bestimmungsstaaten JP, KR, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR)
- Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): LTS LOHMANN THERAPIE-SYSTEME AG [DE/DE]; Lohmannstrasse 2, 56626 Andernach (DE).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KREUTER, Jörg [DE/DE]; Georg-August-Zinn-Strasse 13, 61350 Bad Homburg (DE). LANGER, Klaus [DE/DE]; An der Turnhalle 5, 61137 Schöneck (DE). WEBER, Carolin [DE/DE]; Im Reichen Winkel 34b, 93057 Regensburg

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: NANOPARTICLES MADE OF PROTEIN WITH COUPLED APOLIPOPROTEIN E FOR PENETRATION OF THE BLOOD-BRAIN BARRIER AND METHODS FOR THE PRODUCTION THEREOF

(54) Bezeichnung: NANOPARTIKEL AUS PROTEIN MIT GEKOPPELTEM APOLIPOPROTEIN E ZUR ÜBERWINDUNG DER BLUT-HIRN-SCHRANKE UND VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG

(57) Abstract: The invention relates to nanoparticles for penetration of the blood-brain barrier, characterized in that they consist of a hydrophilic protein or a combination of hydrophilic proteins, preferably serum albumen, most preferably of human origin, which is coupled to apolipoprotein B. the invention also relates to methods for the production of said nanoparticles.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Nanopartikel zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie aus einem hydrophilen Protein oder einer Kombination hydrophiler Proteine bestehen, vorzugsweise aus Serumalbumin, das besonders bevorzugt humanen Ursprungs ist, an die Apolipoprotein B gekoppelt ist, sowie Verfahren zur Herstellung derartiger Nanopartikel.



WO 02/089776 A1

Nanopartikel aus Protein mit gekoppeltem Apolipoprotein E zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke und Verfahren zu ihrer Herstellung

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft Nanopartikel aus einem hydrophilen Protein oder einer Kombination hydrophiler Proteine, vorzugsweise aus Serumalbumin, insbesondere humaner Herkunft, die mittels gebundenem Apolipoprotein E die Blut-Hirn-Schranke überwinden können, um pharmazeutisch oder biologisch aktive Wirkstoffe in den Liquor cerebrospinalis zu transportieren.

15 Nanopartikel sind Partikel mit einer Größe zwischen 10 und 1000 nm, die aus künstlichen oder natürlichen makromolekularen Substanzen hergestellt werden können. An derartige Nanopartikel können Arzneistoffe oder anderes biologisch aktives Material kovalent, ionisch oder adsorptiv gebunden oder in das Material der Nanopartikel inkorporiert werden.

- 20 Bisher waren jedoch nur Nanopartikel aus Polyalkylcyanoacrylaten, die mit Polysorbat 80 (Tween® 80) oder anderen Tensiden überzogen wurden, in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, um hydrophile Arzneistoffe zum Liquor cerebrospinalis zu transportieren und pharmakologische Effekte hervorzurufen. Der Mechanismus dieses Transports beruht nach bisherigen Untersuchungen darauf, dass Apolipoprotein E (ApoE) durch den Überzug aus Polysorbat 80 von den Nanopartikeln adsorbiert wird. Dadurch täuschen diese Partikel vermutlich Lipoprotein-Partikel vor, die von den LDL-Rezeptoren der Gehirnkapillar-Endothelzellen, welche die Lipidversorgung des Gehirns gewährleisten, erkannt und gebunden werden.

35 Eine Reihe von Arzneistoffen konnte mittels mit Polysorbat 80 oder anderen Tensiden überzogenen Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikeln über die Blut-Hirn-Schranke transportiert wer-

den und einen signifikanten pharmakologischen Effekt hervorrufen. Beispiele für derartig verabreichte Arzneimittel sind Dalargin, ein Endorphin-Hexapeptid, Loperamid und Tubocuarin, die beiden NMDA-Rezeptor-Antagonisten MRZ 2/576 bzw.

5 MRZ 2/596 der Fa. Merz, Frankfurt, sowie das Antikrebsmittel Doxorubicin.

Die Nachteile der Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikel liegen jedoch darin, dass Polysorbat 80 nicht physiologisch ist und
10 dass der Transport über die Blut-Hirn-Schranke möglicherweise auf einem toxischen Effekt des Polysorbat 80 beruhen könnte. Ein Überzug von Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikeln mit Polysorbat 80 oder anderen Tensiden ist jedoch essentiell für den Transport der Polybutylcyanoacrylat-
15 Nanopartikel über die Blut-Hirn-Schranke. Die bekannten Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikel haben jedoch den weiteren Nachteil, dass sowohl die Bindung des ApoEs wie auch der Arzneistoffe nur adsorptiv erfolgt. Dadurch liegt das an die Nanopartikel gebundene ApoE bzw. der Arzneistoff im Gleichgewicht mit freiem ApoE bzw. Arzneistoff vor, und es kann
20 nach Injektion in den Organismus eine schnelle Desorption dieser Stoffe von den Partikeln erfolgen. Außerdem binden die meisten Arzneistoffe nicht in ausreichendem Maß an Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikel und können somit nicht mit
25 Hilfe dieses Trägersystems über die Blut-Hirn-Schranke transportiert werden.

Der vorliegenden Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, Nanopartikel zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke bereitzustellen, welche die vorgenannten Nachteile nicht haben und
30 die unter Vermeidung nicht physiologischer Tenside das für den Transport über die Blut-Hirn-Schranke notwendige Apolipoprotein E nicht lediglich adsorbiert haben.

35 Die Aufgabe wurde überraschenderweise durch Nanopartikel gelöst, die aus einem hydrophilen Protein oder einer Kombination hydrophiler Proteine, vorzugsweise aus Serumalbumin,

besonders bevorzugt aus humanem Serumalbumin, oder einem vergleichbaren Protein bestehen, an die Apolipoprotein E kovalent oder über das Avidin/Biotin-System gekoppelt ist.

5 Bei den Albuminen handelt es sich um eine Gruppe von Proteinen, die vor allem in tierischen/menschlichen Flüssigkeiten, z.B. das Serumalbumin im Blut, oder Geweben vorkommen. Albumine sind reich an negativ geladenen Aminosäuren sowie an Leucin und Isoleucin. Im Vergleich zu den sie begleitenden
10 Globulinen besitzen die Albumine niedrigere Molmassen und sind erst durch relativ hohe Salzkonzentrationen ausfällbar.

Auch Gelatine A, Gelatine B, Casein oder vergleichbare Proteine sind als Ausgangsproteine für die erfindungsgemäßen
15 Nanopartikel geeignet.

Das Apolipoprotein E ist eine Komponente der Lipoprotein-Komplexe. Diese Komplexe aus Lipiden und Apolipoproteinen ermöglicht den Transport der im Wasser unlöslichen Lipide im
20 Blut. Das ApoE vermittelt vermutlich den Transport der erfindungsgemäßen Nanopartikel über die Blut-Hirn-Schranke, indem es an die LDL-Rezeptoren der Gehirnkapillar-Endothelzellen bindet.

25 Die erfindungsgemäßen Nanopartikel können zusätzlich ein oder mehrere funktionelle Proteine aufweisen, die über bifunktionale Spacermoleküle an Thiolgruppen der mit Thiolgruppen modifizierten Nanopartikel gebunden sind. Zur Präparation derartiger Nanopartikel können die auf der Ober-
30 fläche der Nanopartikel befindlichen funktionellen Gruppen (Aminogruppen, Carboxylgruppen, Hydroxylgruppen) durch geeignete Reagenzien zu reaktiven Thiolgruppen umgesetzt werden. Funktionelle Proteine können dann über bifunktionale Spacermoleküle, die eine Reaktivität sowohl gegenüber Amino-
35 gruppen als auch freien Thiolgruppen aufweisen, an die Thiolgruppen-modifizierten Nanopartikel gebunden werden.

Die auf diese Weise an die Nanopartikel zu koppelnden funktionellen Proteine können aus der Gruppe ausgewählt werden, die Avidin, Avidinderivate, Apolipoproteine, wie z. B. Apolipoprotein E, aber auch Antikörper, Enzyme und dergleichen umfaßt. Dabei können die funktionellen Proteine selbst eine pharmakologische oder biologische Wirkung haben.

In einer bevorzugten Ausführungsform weisen die erfindungsgemäßen Nanopartikel kovalent gekoppeltes Avidin auf, über das biotinyliertes Apolipoprotein E gebunden werden kann, wie in Figur 1 veranschaulichend dargestellt ist. Avidin selbst ist ein für Biotin hochaffines Glykoprotein, das durch die zuvor erwähnten bifunktionalen Spacermoleküle kovalent an die Thiolgruppen der thiolierten Nanopartikel gebunden sein kann. Durch die kovalente Bindung des Avidins an die Nanopartikel kann nicht nur biotinyliertes ApoE, das für den Transport über die Blut-Hirn-Schranke notwendig ist, gebunden werden, sondern es können eine Vielzahl von biotinylierten Molekülen besonders effizient von den Avidinmodifizierten Nanopartikeln gebunden werden. Besonders bevorzugt werden dabei pharmakologisch oder biologisch aktive Moleküle.

Um pharmakologische Effekte zu vermitteln, können die erfindungsgemäßen Nanopartikel pharmakologisch oder biologisch aktive Substanzen aufweisen. Diese Wirkstoffe können in die Nanopartikel inkorporiert sein oder werden von den Nanopartikeln gebunden. Dabei kann die Bindung der pharmakologisch oder biologisch aktiven Wirkstoffe sowohl kovalent, komplexierend über das Avidin-Biotin-System als auch inkorporativ oder adsorptiv erfolgen.

Die erfindungsgemäßen Nanopartikel eignen sich besonders gut, um Arzneistoffe, die keinen oder keinen ausreichenden Übergang über die Blut-Hirn-Schranke aufweisen, wie beispielsweise Dalargin, Loperamid, Tubocuarin oder Doxorubicin oder dergleichen, zu binden und über die Blut-Hirn-Schranke

zu transportieren und pharmakologische Effekte hervorzurufen.

Das Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Nanopartikeln aus einem hydrophilen Protein oder einer Kombination hydrophiler Proteine zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke umfaßt die folgenden Schritte:

- Desolvatieren einer wäßrigen Lösung eines hydrophilen Proteins oder einer Kombination hydrophiler Proteine,
- Stabilisieren der durch Desolvatation entstandenen Nanopartikel durch Quervernetzung,
- Umsetzen eines Teils der funktionellen Gruppen auf der Oberfläche der stabilisierten Nanopartikel zu reaktiven Thiolgruppen,
- kovalentes Anheften funktioneller Proteine mittels bifunktionaler Spacermoleküle,
- Biotinylierung von Apolipoprotein E, sofern die Partikel nicht kovalent gekoppeltes Apolipoprotein E aufweisen,
- Beladen der Avidin-modifizierten Nanopartikel mit biotinyliertem ApoE und dem zu verabreichenden pharmakologischen Wirkstoff.

Für die Herstellung der Nanopartikel wird ein hydrophiles Protein oder eine Kombination hydrophiler Proteine als Ausgangsmaterial verwendet. Vorzugsweise wird eine wäßrige Lösung von Serumalbumin, besonders bevorzugt von humanem Serumalbumin, unter Rühren desolvatisiert. Die entstehenden Nanopartikel werden durch Quervernetzung stabilisiert und die funktionellen Gruppen (Aminogruppen, Carboxylgruppen, Hydroxylgruppen) auf der Oberfläche der Nanopartikel werden durch geeignete Reagenzien zu reaktiven Thiolgruppen umgesetzt.

Die Desolvatation aus dem wäßrigen Lösungsmittel erfolgt vorzugsweise durch den Zusatz von Ethanol. Prinzipiell ist eine Desolvatation auch durch den Zusatz anderer wassermischbarer Nichtlösungsmittel für hydrophile Proteine wie Aceton, Isopropanol oder Methanol möglich. So wurde Gelatine als Ausgangsprotein erfolgreich durch Zugabe von Aceton desolvatisiert. Gleichfalls ist eine Desolvatation von in wäßriger Phase gelösten Proteinen durch Zugabe von strukturbildenden Salzen wie Magnesiumsulfat oder Ammoniumsulfat möglich. In diesem Fall spricht man von Aussalzen.

Als Quervernetzer zur Stabilisierung der Nanopartikel kommen bifunktionale Aldehyde, vorzugsweise Glutaraldehyd, sowie Formaldehyd in Frage. Ferner ist eine Quervernetzung der Nanopartikelmatrix durch thermische Prozesse möglich. Stabile Nanopartikelsysteme wurden bei 60°C über Zeiträume von mehr als 25 Stunden oder 70°C über Zeiträume von mehr als 2 Stunden erhalten.

Die Thiolierung der Nanopartikeloberfläche kann nach verschiedenen Prinzipien durchgeführt werden. Vorzugsweise werden die Aminogruppen auf der Partikeloberfläche mit 2-Iminothiolan, das mit primären Aminogruppen auf der Partikeloberfläche reagiert, zu freien Thiolgruppen auf der Partikeloberfläche umgesetzt. Daneben können Thiolgruppen auch durch reduktive Spaltung der an der Oberfläche der Nanopartikelmatrix vorhandenen Disulfid-Bindungen mit Dithiotreitol (DTT) erhalten werden. Alternativ können freie Carboxylgruppen der Partikeloberfläche mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) / Cystein oder mit EDC / Cystaminiumdichlorid umgesetzt und die so eingeführten Disulfid-Bindungen nachfolgend mit DTT reduktiv gespalten werden.

Funktionelle Proteine können über bifunktionale Spacermoleküle, die eine Reaktivität sowohl gegenüber Aminogruppen als auch gegenüber freien Thiolgruppen aufweisen, an die

Thiolgruppen-modifizierten Nanopartikel gekoppelt werden. Anwendbar sind heterobifunktionale Spacermoleküle mit Reaktivitäten gegenüber Carboxyl- oder Hydroxylgruppen, aber auch homobifunktionale Spacermoleküle mit Reaktivitäten gegenüber Aminogruppen. Eine bevorzugte Substanz, die die Funktion eines bifunktionalen Spacermoleküls übernehmen kann, ist m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinimidester (Sulfo-MBS). Neben m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinimidester wurden auch weitere heterobifunktionale Spacermoleküle wie Sulfosuccinimidyl-4-[N-maleimidomethyl]-cyclohexan-1-carboxylat (Sulfo-SMCC) oder Sulfosuccinimidyl-2-[m-azido-o-nitrobenzamido]-ethyl-1,3'-dithiopropionat (SAND) sowie die homobifunktionalen Spacermoleküle Dimethyl-3,3'-dithiobispropionimidat-dihydrochlorid (DTBP) oder 3,3'-Dithiobis[sulfo-succinimidylpropionat] (DTSSP) erfolgreich eingesetzt. Es werden jedoch heterobifunktionale Spacermoleküle bevorzugt, da homobifunktionale Spacermoleküle als Nebenreaktion zu der Anbindung eines funktionalen Proteins an die Nanopartikeloberfläche auch zu einer möglichen intramolekularen Quervernetzung führen.

In einem besonders bevorzugten Verfahren wird Avidin oder ein Avidin-Derivat mittels der bifunktionalen Spacermoleküle an die thiolierten Nanopartikel gekoppelt. Dieses Zwischenprodukt, Avidin-modifizierte Nanopartikel, stellt ein universelles Trägersystem für eine Vielzahl biotinylierter Substanzen dar, die über die Avidin-Biotin-Komplexbildung gebunden werden können.

Zur Bindung des humanen Apolipoproteins E an die Avidin-modifizierten Nanopartikel kann das Apolipoprotein E durch Umsetzung mit N-Hydroxysuccinimidobiotin (NHS-Biotin) biotinyliert werden. Andere Biotinylierungsreagenzien, die mit Aminogruppen oder anderen funktionellen Gruppen des zu bindenden Proteins reagieren, sind ebenfalls anwendbar. Als weitere funktionelle Gruppen des zu bindenden Proteins kommen für die Biotinylierung auch freie Sulfhydrylgruppen oder

Carboxylgruppen in Frage. Alternative Biotinylierungsreagenzien für Aminogruppen unterscheiden sich von dem NHS-Biotin in der aminoreaktiven Funktionalität, indem sie z.B. Pentafluorphenyl-Gruppen anstelle von Succinimido-Gruppen haben, oder in dem Bereich zwischen Biotin und der aminoreaktiven Funktionalität.

Um pharmakologische Effekte zu vermitteln, werden pharmazeutisch oder biologisch aktive Substanzen in die Partikel eingearbeitet oder direkt bzw. indirekt an die Avidinmodifizierten Nanopartikel gebunden. Die Avidinmodifizierten Nanopartikel können gleichzeitig oder in beliebiger Reihenfolge mit biotinyliertem Apolipoprotein E und einem pharmazeutischen Wirkstoff beladen werden. Dabei kann die Bindung des Wirkstoffes sowohl kovalent, komplexierend über das Avidin-Biotin-System als auch adsorptiv erfolgen.

Die erfindungsgemäßen Nanopartikel aus einem hydrophilen Protein oder einer Kombination hydrophiler Proteine, die Apolipoprotein E gebunden haben, eignen sich, pharmazeutisch oder biologisch aktive Wirkstoffe, die sonst die Blut-Hirnschranke nicht passieren würden, insbesondere hydrophile Wirkstoffe, über die Blut-Hirnschranke zu transportieren und pharmakologische Effekte hervorzurufen. Beispiele für derartige Wirkstoffe sind Dalargin, Loperamid, Tubocuarin, Doxorubicin oder dergleichen.

Somit sind die beschriebenen wirkstoffbeladenen Nanopartikel zur Behandlung einer Vielzahl cerebraler Erkrankungen geeignet. Dabei werden die an das Trägersystem gebundenen Wirkstoffe nach dem jeweiligen Therapieziel ausgewählt. Das Trägersystem bietet sich vor allem für die Wirkstoffe an, die keinen oder keinen ausreichendem Übergang über die Blut-Hirnschranke aufweisen. Als Wirkstoffe kommen Zytostatika zur Therapie cerebraler Tumore in Betracht, Wirkstoffe zur Therapie viraler Infektionen im Cerebralsbereich, beispielsweise HIV-Infektionen, aber auch Wirkstoffe zur Therapie von

Demenz-Erkrankungen, um nur einige Anwendungsgebiete aufzuzählen.

FIG. 1 zeigt eine bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Nanopartikel ohne Wirkstoff oder weiteres funktionelles Protein.

Nachfolgend wird die Erfindung anhand einer beispielhaften Ausführungsform veranschaulicht, wobei diese Darstellung den Sinn und das Wesen der Erfindung in keiner Weise einschränkend aufgefasst werden soll.

Zur Herstellung von Nanopartikeln aus humanem Serumalbumin (HSA) wurden 200 mg humanes Serumalbumin in 2,0 ml gereinigtem Wasser gelöst. Zu dieser Lösung wurden unter Rühren auf einem Magnetrührer (500 rpm) 8,0 ml 96 Vol.-% Ethanol tropfenweise zugegeben.

Die erzeugten Nanopartikel wurden stabilisiert, indem dem Reaktionsansatz 235 µl einer wässrigen, 8%-igen (m/v) Glutaraldehydlösung zugegeben und über 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt wurde. Die stabilisierten Nanopartikel wurden durch fünfmaliges Abzentrifugieren (16.000 rcf, 8 min) und Redispergieren in 1,5 ml gereinigtem Wasser aufgereinigt. Durch gravimetrische Bestimmung wurde der resultierende Gehalt von Nanopartikeln in der Suspension festgestellt.

Anschließend wurden 2,0 ml der Nanopartikel-Suspension mit 2,0 ml einer Lösung von 13 mg 2-Iminoethiolan (Traut's Reagenz) in Tris-Puffer (pH 8,5) versetzt und über 24 Stunden gerührt, um die Partikeloberfläche zu thiolieren. Die Nanopartikel wurden nach Thiolierung wie oben beschrieben aufgereinigt.

Das Avidin-Derivat NeutrAvidin™ wurde über m-Maleimido-benzoyl-N-hydroxysulfosuccinimidester (Sulfo-MBS), eine als

bifunktionales Spacermolekül fungierende Substanz, kovalent an die thiolierten Nanopartikeln gebunden. Zu diesem Zweck wurde das Avidin-Derivat aktiviert, indem eine Lösung von 5,0 mg NeutrAvidin™ in 1,0 ml PBS-Puffer (pH 7,0) mit 1,6 mg Sulfo-MBS versetzt und über 1 Stunde bei Raumtemperatur ge-
5 gerührt wurde. Freies Sulfo-MBS wurde über eine Größenausschlußchromatographie von dem aktivierten NeutrAvidin abgetrennt.

10 Die Fraktionen, in denen durch spektrophotometrische Detektion bei 280 nm Wellenlänge NeutrAvidin nachgewiesen werden konnte, wurden vereinigt und mit 2,0 ml der thiolierten Nanopartikel versetzt und über 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Avidin-modifizierten HSA-Nanopartikel wurden
15 wie oben beschrieben aufgereinigt.

Apolipoprotein E (ApoE) wurde biotinyliert, indem 250 µg ApoE in 125 µl isotonem PBS-Puffer, pH 7,4, gelöst wurden und diese Lösung mit einer Lösung von 150 µg NHS-Biotin (N-Hydroxysuccinimidobiotin) in 15 µl DMSO versetzt wurde. Nach
20 einer Reaktionszeit von 2 Stunden bei 10°C unter Rühren wurde diese Mischung mit weiteren 300 µl PBS-Puffer, pH 7,4, verdünnt. Noch freies NHS-Biotin wurde über eine Größenausschlusschromatographie von dem biotinylierten ApoE abgetrennt. Die Fraktionen, in denen durch photometrische Detek-
25 tion bei 280 nm Wellenlänge ApoE nachweisbar war, wurden vereinigt und gefriergetrocknet.

Die Avidin-modifizierten HSA-Nanopartikel wurden unmittelbar
30 vor dem Tierversuch mit dem biotinylierten ApoE und dem Arzneistoff Dalargin beladen. Hierzu wurde das gefriergetrocknete ApoE in 250 µl destilliertem Wasser gelöst und mit 280 µl einer HSA-Nanopartikelsuspension, die 5,9 mg Avidin-modifizierte HSA-Nanopartikel enthielt, versetzt. Eine Lö-
35 sung von 1,125 mg Dalargin in 470 µl Wasser wurde zugegeben und die Mischung wurde über 3 Stunden bei Raumtemperatur in-

kubiert. Nach dieser Inkubation wurde die Mischung durch Zugabe von 500 µl isotonem PBS-Puffer, pH 7,4, verdünnt.

5 Eine Quantifizierung der Beladung der Avidin-modifizierten HSA-Nanopartikel mit Dalargin ergab, dass bei einem Verhältnis von Dalargin / Nanopartikeln = 191 µg/mg eine adsorptive Bindung von 23,7 µg/mg (= 12,4%) Dalargin erfolgte.

10 Die applikationsfertige Zubereitung enthielt in einem Gesamtvolumen von 1,5 ml isotonem PBS-Puffer:

- 3,93 mg/ml Avidin-modifizierte HSA-Nanopartikel
- 167 µg/ml ApoE (über Avidin-Biotin-System an die Nanopartikel gebunden)
- 15 - 0,75 mg/ml Dalargin (davon 12,4 % adsorptiv an Nanopartikel gebunden).

Die Zubereitung wurde Mäusen i.v. in einer Dosierung von 7,5 mg/kg Dalargin appliziert. Das entspricht ausgehend von einem durchschnittlichen Körpergewicht einer Maus von 20 g,
20 einer Applikationsmenge von 200 µl der oben aufgeführten Zubereitung je Maus.

Der analgetische Effekt (Nociceptive Response) wurde mit Hilfe des Tail-Flick-Tests ermittelt, bei dem ein heisser
25 Lichtstrahl auf den Schwanz der Maus projiziert und die Zeit gemessen wird, bis die Maus den Schwanz wegzieht. Nach 10 Sekunden (= 100 % MPE) wurde das Experiment abgebrochen, um der Maus keinen Schaden zuzufügen. Der maximal mögliche analgetische Effekt (MPE = maximally possible effect) wurde
30 gemäß der folgenden Formel ermittelt:

$$\% \text{ MPE} = \frac{\text{Reaktionszeit nach Applikation} - \text{Reaktionszeit vor Applikation}}{\text{Abbruchzeit} - \text{Reaktionszeit vor Applikation}} \times 100$$

35

Negative MPE-Werte ergeben sich, wenn die Maus ihren Schwanz nach Gabe der Zubereitung früher wegzieht als vor der Behandlung.

Mit Hilfe Dalargin-beladener Avidin-modifizierter HSA-Nanopartikel wurden nach intravenöser Injektion die in Tabelle 1 dargestellten analgetischen Effekte erreicht.

5

Tabelle 1

Analgetischer Effekt [% MPE] bei Mäusen (n=6) nach i.v. Applikation von Dalargin (7,5 mg/kg) in Form einer der aufgeführten Präparationen. (MPE = Maximal Possible Effect)

Präparation	30 min	45 min	90 min	120 min
HSA-Avidin-Nanopartikel + ApoE + Dalargin	25,1 ± 12,4	49,0 ± 23,7	2,1 ± 19,6	-0,23 ± 12,3
Kontrollen*				
HSA-Avidin-Nanopartikel + Dalargin	-2,6 ± 3,9	-5,4 ± 10,9	-14,4 ± 17,4	-9,6 ± 20,6
PBCA-Nanopartikel + Dalargin + Polysorbat 80	35,2 ± 5,8	49,5 ± 4,5	36,5 ± 13,7	7,1 ± 6,3
Dalargin-Lösung	10,0 ± 9,8	9,3 ± 2,8	4,7 ± 5,1	2,0 ± 6,1

* Die PBCA-Nanopartikel + Dalargin + Polysorbat 80 und die Dalargin-Lösungs-Vergleichsdaten stammen aus einem früheren Experiment.

Die Ergebnisse zeigen, dass die mit den Avidin-modifizierten HSA-Nanopartikeln erzielten analgetischen Effekte den Effekten entsprechen, die mit den Polybutylcyano-acrylat Nanopartikeln (PBCA-Nanopartikel) erreicht werden können.

10

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Nanopartikel zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke,
5 dadurch gekennzeichnet, dass sie aus einem hydrophilen Protein oder einer Kombination hydrophiler Proteine bestehen, an die Apolipoprotein E gekoppelt oder gebunden ist.
- 10 2. Nanopartikel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das mindestens ein hydrophiles Protein aus der Gruppe ausgewählt ist, die Serumalbumin, Gelatine A, Gelatine B, Casein und vergleichbare Proteine, oder eine Kombination dieser Proteine umfaßt.
- 15 3. Nanopartikel nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein hydrophiles Protein humanen Ursprungs ist.
- 20 4. Nanopartikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass sie ein oder mehrere unterschiedliche funktionelle Proteine aufweisen, die über bifunktionale Spacermoleküle an Thiolgruppen von Thiolgruppen-modifizierten Nanopartikeln gebunden sind.
- 25 5. Nanopartikel nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die funktionellen Proteine ausgewählt sind aus der Gruppe, die Avidin, Avidin-Derivate, Apolipoproteine, Antikörper, Enzyme, Hormone, Zytostatika und dergleichen
30 umfaßt.
- 35 6. Nanopartikel nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass biotinyliertes Apolipoprotein E über kovalent gekoppeltes Avidin gebunden ist.
7. Nanopartikel nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein weiteres biotinyliertes funktionel-

les Protein über kovalent gekoppeltes Avidin gebunden ist.

8. Nanopartikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
5 dadurch gekennzeichnet, dass sie pharmakologisch oder biologisch aktive Wirkstoffe inkorporiert oder gebunden haben.
9. Nanopartikel nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet,
10 dass die pharmakologisch oder biologisch aktiven Wirkstoffe auf der Partikeloberfläche gebunden sind.
10. Nanopartikel nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet,
15 dass die pharmakologisch oder biologisch aktiven Wirkstoffe kovalent, komplexierend über das Avidin-Biotin-System oder adsorptiv gebunden sind.
11. Nanopartikel nach einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Wirkstoffe ausgewählt sind aus
20 der Gruppe, die Dalargin, Loperamid, Tubocuarin und Doxorubicin umfaßt.
12. Verfahren zur Herstellung von Nanopartikeln aus einem hydrophilen Protein oder einer Kombination hydrophiler
25 Proteine, zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke, dadurch gekennzeichnet, dass es die folgenden Schritte umfaßt:
- Desolvatieren einer wäßrigen Lösung eines hydrophilen Proteins oder einer Kombination hydrophiler Proteine,
30
 - Stabilisieren der durch Desolvatation entstandenen Nanopartikel durch Quervernetzung,
 - Umsetzen eines Teils der funktionellen Gruppen auf der Oberfläche der stabilisierten Nanopartikel zu
35 reaktiven Thiol-Gruppen,

- kovalentes Anheften funktioneller Proteine, vorzugsweise von Avidin, mittels bifunktionaler Spacermoleküle,
 - Biotinylierung des Apolipoprotein E,
 - 5 - Beladen der Avidin-modifizierten Nanopartikel mit biotinyliertem Apolipoprotein E,
 - Beladen der Avidin-modifizierten Nanopartikel mit biotinyliertem Apolipoprotein E und weiteren funktionellen Proteinen oder pharmazeutisch oder biologisch aktiven Wirkstoffen.
 - 10
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass das hydrophile Protein aus der Gruppe ausgewählt ist, die Serumalbumin, Gelatine A, Gelatine B, Casein und
- 15 vergleichbare Proteine, oder eine Kombination dieser Proteine umfaßt.
14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, dass das hydrophile Protein humanen Ursprungs ist.
- 20
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Desolvatieren durch Rühren und Zugabe eines wassermischbaren Nichtlösungsmittels für hydrophile Proteine oder durch Aussalzen erfolgt.
- 25
16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass das wassermischbare Nichtlösungsmittel für hydrophile Proteine aus der Gruppe ausgewählt wird, die Ethanol, Methanol, Isopropanol, und Aceton umfaßt.
- 30
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass zum Stabilisieren der Nanopartikel thermische Prozesse oder bifunktionale Aldehyde oder Formaldehyd verwendet wird.
- 35

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass als bifunktionales Aldehyd Glutaraldehyd verwendet wird.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass als Thiolgruppen-modifizierendes Agens eine Substanz verwendet wird, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die 2-Iminothiolan, eine Kombination aus 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid und Cystein oder eine Kombination aus 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid und Cystaminiumdichlorid sowie Dithiotreitol umfaßt.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass als bifunktionales Spacermolekül eine Substanz verwendet wird, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinimidester, Sulfosuccinimidyl-4-[N-maleimido-methyl]cyclohexan-1-carboxylat, Sulfosuccinimidyl-2-[m-azido-o-nitrobenzamido]-ethyl-1,3'-dithiopropionat, Dimethyl-3,3'-dithiobispropionimidat-dihydrochlorid und 3,3'-Dithiobis[sulfosuccinimidylpropionat] umfaßt.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Wirkstoffe ausgewählt sind aus der Gruppe, die Dalargin, Loperamid, Tubocuarin und Doxorubicin umfaßt.
22. Verwendung von Nanopartikeln, umfassend ein hydrophiles Protein oder eine Kombination hydrophiler Proteine, die Apolipoprotein E gebunden haben, zum Transport pharmazeutisch oder biologisch aktiver Wirkstoffe über die Blut-Hirn-Schranke.
23. Verwendung nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eines der hydrophilen Proteine aus der Gruppe ausgewählt ist, die Serumalbumin, Gelatine A, Ge-

latine B, Casein und vergleichbare Proteine, oder eine Kombination dieser Proteine umfaßt.

- 5 24. Verwendung nach Anspruch 22 oder 23, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eines der hydrophilen Proteine humanen Ursprungs ist.
- 10 25. Verwendung von Nanopartikeln nach einem der Ansprüche 22 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass die Wirkstoffe ausgewählt sind aus der Gruppe, die Dalargin, Loperamid, Tubocuarin und Doxorubicin umfaßt.
- 15 26. Verwendung von Nanopartikeln nach einem der Ansprüche 22 bis 25, dadurch gekennzeichnet, dass sie zur Behandlung cerebraler Erkrankungen eingesetzt werden.

20

25

30

35

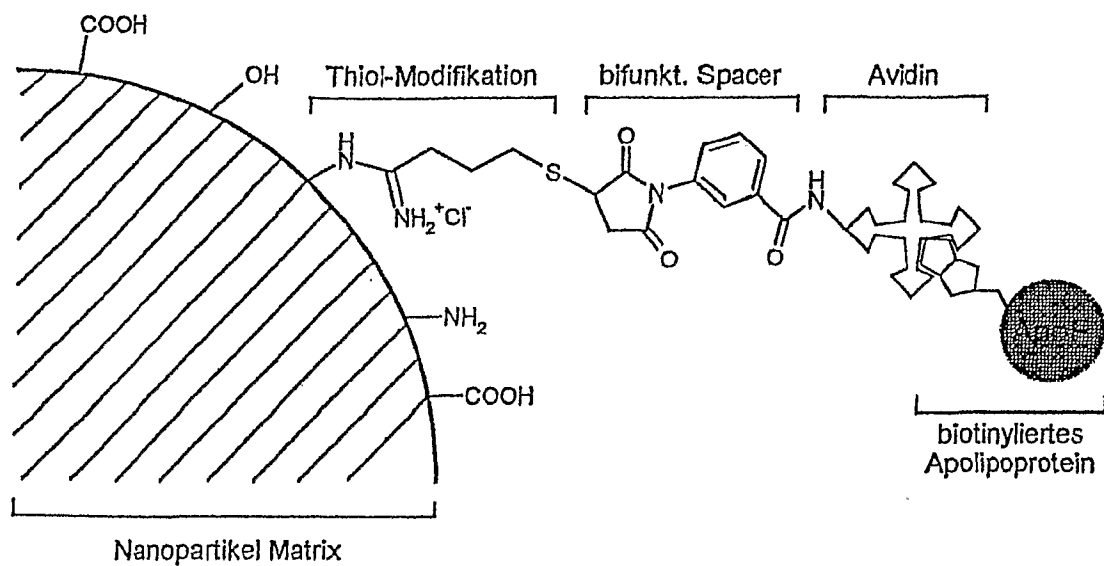


FIG. 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In ☐ onal Application No

PCT/EP 02/04735

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K9/51 A61K47/42 A61K47/48 A61P25/04 A61P25/28
A61K31/197 A61K31/451 A61K31/4741 A61K31/704

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>LANGER K ET AL: "Preparation of avidin-labeled protein nanoparticles as carriers for biotinylated peptide nucleic acid"</p> <p>EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 49, no. 3, 2 May 2000 (2000-05-02), pages 303-307, XP004257171</p> <p>ISSN: 0939-6411</p> <p style="text-align: center;">--- -/-</p>	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 August 2002

Date of mailing of the international search report

30/08/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Felder, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/04735

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>KREUTER J ET AL: "INFLUENCE OF THE TYPE OF SURFACTANT ON THE ANALGESIC EFFECTS INDUCED BY THE PEPTIDE DALARGIN AFTER ITS DELIVERY ACROSS THE BLOOD-BRAIN BARRIER USING SURFACTANT-COATED NANOPARTICLES" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, vol. 49, no. 1, 10 November 1997 (1997-11-10), pages 81-87, XP000667154 ISSN: 0168-3659</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 02/04735

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

MISSING AT THE TIME OF PUBLICATION

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

II nales Aktenzeichen

PCT/EP 02/04735

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 A61K9/51 A61K47/42 A61K47/48 A61P25/04 A61P25/28
A61K31/197 A61K31/451 A61K31/4741 A61K31/704

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K A61P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>LANGER K ET AL: "Preparation of avidin-labeled protein nanoparticles as carriers for biotinylated peptide nucleic acid"</p> <p>EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, Bd. 49, Nr. 3, 2. Mai 2000 (2000-05-02), Seiten 303-307, XP004257171</p> <p>ISSN: 0939-6411</p> <p>---</p> <p>---/---</p>	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☐ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

12. August 2002

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

30/08/2002

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Felder, C

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

I onales Aktenzeichen
PCT/EP 02/04735

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>KREUTER J ET AL: "INFLUENCE OF THE TYPE OF SURFACTANT ON THE ANALGESIC EFFECTS INDUCED BY THE PEPTIDE DALARGIN AFTER ITS DELIVERY ACROSS THE BLOOD-BRAIN BARRIER USING SURFACTANT-COATED NANOPARTICLES" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, Bd. 49, Nr. 1, 10. November 1997 (1997-11-10), Seiten 81-87, XP000667154 ISSN: 0168-3659</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/04735

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Obwohl die Ansprüche 22-26 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.